

FUNGOS E MICOTOXINAS EM CASTANHA DO BRASIL

CAROLINA C. M. **ALBERS**¹; THAIANE O. **CALDERARI**³; LARISSA S. **FERRANTI**³;
MARTA H. **TANIWAKI**³; MARGARETE M. **OKAZAKI**³; BEATRIZ T. **IAMANAKA**²

Nº 10216

RESUMO

Castanhas do Brasil (*Bertholletia excelsa*) são um dos mais importantes produtos extraídos da região do Amazonas. Um dos maiores desafios da produção da castanha do Brasil é o controle dos altos níveis de contaminação dos fungos toxigênicos e da conseqüente produção de aflatoxinas por estas espécies. Os objetivos deste estudo foram identificar a micobiota e a capacidade de produção de aflatoxinas por isolados de *Aspergillus* da seção *Flavi* e avaliar os níveis de aflatoxinas nas amêndoas da castanha do Brasil. Até o momento 57 amostras de castanha do Brasil provenientes do Pará (38), Amazonas (12) e de mercados de São Paulo (7) foram analisadas. Um total de 1222 fungos da seção *Flavi* foram isolados, correspondendo a 16% do total de fungos, e a infecção variou de 0 a 100%. Neste grupo estavam presentes, *Aspergillus flavus* (49,6%), *Aspergillus nomius* (17,7%) e 32,7% (6 grupos diferentes) que estão sendo identificados. Em relação ao *A. flavus* e *A. nomius*, 27,4% e 100%, foram produtores de aflatoxinas respectivamente. Mais de metade (51%) das amostras de amêndoas apresentaram contaminação maior que o limite de detecção por aflatoxinas. A maior contaminação foi obtida nas amostras dos mercados de Para, com a média de 12,73µg/Kg.

ABSTRACT

Brazil nuts (*Bertholletia excelsa*) are one of the most important products extracted from the Amazon forest region. One of the major challenges for Brazil nut production is to control the high levels of aflatoxigenic fungal contamination and consequent aflatoxin production from these species. The objectives of this study were to identify the mycobiota of Brazil nut kernel and shell, to evaluate the ability of aflatoxin production by isolates of *Aspergillus* section *Flavi* and to evaluate the levels of aflatoxins in Brazil nut kernels. Up to now, 57 samples of Brazil nuts from Pará (38), Amazonas (12) and São Paulo markets (7) have been analyzed. A total of 1273 section *Flavi* was isolated, corresponding 16.7% of

1. Bolsista CNPq: Graduação em Engenharia de Alimentos, FEA/UNICAMP, Campinas-SP, ✉ carolina_albers@hotmail.com

2. Orientador: Pesquisador, Centro de Ciência e Qualidade de Alimentos/ITAL, Campinas-SP

3. Colaborador: Centro de Ciência e Qualidade de Alimentos/ITAL – Campinas-SP

the total fungal, and the infection varied from 0 to 100%. In this group it was presented *Aspergillus flavus* (49.6%), *Aspergillus nomius* (17.7%) and 32.7% (6 different groups) that are being identified. Regarding *A. flavus* and *A. nomius*, 27.4% and 100%, respectively were aflatoxin producers. Over a half (51%) of the kernel samples showed aflatoxin levels higher than the detection limit. The highest level was found in samples from markets in Pará with an average of 12.73µg/Kg.

INTRODUÇÃO

A castanha do Brasil pertence à família *Lecythidaceae*; gênero: *Bertholletia*; espécie: *excelsa*, também é conhecida como castanha do Pará e castanha da Amazônia. A espécie ocorre na Venezuela, Colômbia, Peru, Bolívia, Suriname e Guianas, mas no Brasil existe em maior número e formações compactas. A espécie ocorre em todos os estados da Amazônia Legal (Acre, Amapá, Amazonas, Maranhão, Mato Grosso, Pará, Rondônia, Roraima, Tocantins), sendo que os estados do Pará, Mato Grosso, Amazonas, Acre e Maranhão concentram as maiores populações de castanheiras (GREENPEACE, 2008; VALOIS, 2003).

Dentre os principais problemas identificados na produção da castanha do Brasil está a elevada contaminação por fungos produtores de aflatoxinas. Este problema tem se constituído um forte entrave para a comercialização do produto, principalmente no mercado externo, dado ao rigoroso controle de países europeus e Estados Unidos em relação aos níveis de toxinas presentes nos alimentos. Esse quadro traz uma grande preocupação com relação à segurança alimentar e a saúde do consumidor em relação à contaminação dos produtos consumidos no Brasil. Eles podem se constituir em grande risco para a saúde da população brasileira que consome a castanha e seus produtos derivados. Além disso, as informações sobre a contaminação de nossa produção castanheira por fungos produtores de toxinas, como aflatoxinas são insuficientes.

OBJETIVOS

- Isolar e identificar fungos toxigênicos em amostras de castanhas do Brasil, coletadas no Estado do Pará e Amazonas e no comércio no Estado de São Paulo;
- Avaliar a capacidade dos isolados em relação à capacidade de produção de aflatoxinas;
- Avaliar a presença das aflatoxinas nas amostras de castanhas do Brasil

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras

Foram analisadas um total de 56 amostras de castanha do Brasil provenientes diferentes etapas da cadeia produtiva nos estados do Pará e Amazonas. Na floresta, logo após a colheita dos ouriços, nas processadoras e no comércio e feiras da região. Além disso, foram analisadas também amostras do comércio da região de Campinas/SP.

Cerca de 2Kg de amostra foram coletadas para análise micológica e de micotoxinas. As amostras com casca foram descascadas manualmente e plaqueadas.

Plaqueamento das castanhas e isolamento e identificação dos fungos

Para isolamento da micobiota, as amêndoas foram desinfectadas superficialmente com 0,4% de solução de hipoclorito de sódio por 2 minutos e plaqueadas (50 pedaços de unidades diferentes de castanha) em meio de cultura Ágar Dicloran 18% Glicerol (DG18). As placas foram incubadas a 25°C/5 dias. Os resultados foram expressos em porcentagem de pedaços infectados conforme a metodologia de Pitt & Hocking (1997).

Para identificação dos fungos isolados, as cepas suspeitas de fungos *Aspergillus* do grupo Flavi foram isoladas em CYA, MEA e AFPA a 25°C também por 7 dias, sendo identificadas de acordo com a chave de identificação para *Aspergillus*, proposta por Klich & Pitt 1988.

Avaliação do potencial de produção de aflatoxinas pelos fungos Aspergillus do grupo Flavi

Os isolados foram inoculados em meio YESA e incubados à 25°C por 7 dias. Um plug das cepas dos fungos foram cortados com auxílio de um bisturi e 3 gotas da solução Clorofórmio:Metanol (1:1) foram utilizadas para a extração da toxina (FILTENBORG *et al.*, 1983). Os pedaços dos fungos foram aplicados em placas de Cromatografia de Camada Delgada silicagel-G de 500 μ m de espessura, juntamente com o padrão de aflatoxinas. A fase móvel utilizada foi Tolueno, Acetato de Etila, Ácido Fórmico 90% e Clorofórmio (7:5:2:5). A leitura foi realizada em câmara UV em dois diferentes comprimentos de onda, 356nm e 254 nm.

Metodologia para análise de aflatoxinas em castanha o Brasil

Vinte e cinco gramas de amostra moída foram adicionadas de dois gramas de NaCl e extraídas com 100mL de uma solução de metanol:água (8:2, v/v) em homogeneizador Ultra-Turrax (Polytron, Suíça) a 10.000rpm por 3 minutos. Esta solução homogeneizada foi duplamente filtrada através dos filtros Whatman n° 2 e Whatman A-H

de microfibra de vidro. Em seguida, 10mL do filtrado foram diluídos em 60mL de PBS e aplicados em colunas de imunoafinidade Aflatest WB-Vicam com fluxo de 2-3 mL/ min e seguindo-se à lavagem da coluna com 30mL de água destilada. As aflatoxinas (AF) foram eluídas com 1250µL de metanol e em seguida diluída com água Milli Q até completar 3mL (STROKA *et al.*, 2000).

Condições cromatográficas

Foi utilizado um sistema Shimadzu LC-10VP HPLC system (Shimadzu, Japão) com detector de fluorescência à 362nm de excitação e 455nm de emissão para aflatoxinas G₁ e G₂ e 425nm de emissão para aflatoxinas B₁ e B₂. Foi utilizada coluna Shimadzu Shimpack ODS (5µm, 4,6x250mm) para a análise cromatográfica. O sistema estava associado com um reator eletroquímico Kobracell (R-Biopharm) para derivatização pós-coluna das aflatoxinas B₁ e G₁, ligado a uma corrente de 100µA. A fase móvel utilizada foi água:acetonitrila:metanol (6:2:3, v/v/v), adicionada de 119mg de KBr e 350µL de ácido nítrico 4M por litro, em um fluxo de 1mL/min. O volume de injeção foi de 100µL.

Validação metodologia

Para a validação da metodologia foram realizados testes de recuperação e calculados os limites de detecção e quantificação. Para a recuperação das aflatoxinas utilizou-se a metodologia descrita acima, realizando-se a contaminação de uma amostra de castanha isenta da micotoxina nos níveis de 0,5; 5,0; e 15,0 µg/Kg respectivamente de aflatoxinas totais, em triplicata. Para determinação do limite de detecção (LOD) foram realizadas 8 extrações paralelas e após quantificação foi calculado o desvio padrão entre as mesmas. O limite de detecção foi determinado conforme recomendações do Eurachem Guide (1998), com valor *t* unilateral de 2,998 para 7 graus de liberdade e com 99% de confiança. O limite de quantificação foi calculado multiplicando o valor do desvio padrão por 10.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os principais fungos potencialmente produtores de aflatoxinas foram identificados como: *Aspergillus flavus*, *Aspergillus nomius* e *Aspergillus section Flavi*. As maiores médias de infecção por estas espécies foram encontradas nas amostras do mercado de Manaus e nas unidades processadoras do Pará. A tabela 1 apresenta o número de amostras avaliadas e sua origem, bem como as médias de infecção por espécies da seção *Flavi* e sua variação.

Tabela 1. Médias de infecção por espécies da seção Flavi em relação à origem das amostras			
Origem	nº amostras	Média de infecção (%)	Variação
Floresta - Pará	7	7,4	0-24
Processadora - Pará	20	34,9	0-100
Mercado - Belém	11	19,8	0-100
Mercado - Manaus	12	40,5	0-100
Mercado - São Paulo	7	5,3	0-22

A tabela 2 apresenta a média de infecção pelas espécies toxigênicas, em relação ao total de amostras analisadas.

Tabela 2 – Número total de espécies potencialmente aflatoxigênicas e valores médios de infecção				
Espécies isoladas	Total Isolados	%	Média Infecção (%)	Variação
<i>A. flavus</i>	585		13,2	0-100
<i>A. flavus</i> produtores aflatoxinas	148	25,3		
Grupo <i>Flavi</i> [†]	637		13,9	0-100
Grupo <i>Flavi</i> produtores de aflatoxinas	320	50		

[†] Inclui *Aspergillus nomius* e mais seis grupos distintos ainda não identificados

Dentre os fungos produtores de aflatoxinas, foram isolados 1222 espécies, incluindo *A. flavus* e demais grupos da seção *Flavi* que estão sendo identificados por técnicas moleculares e metabólitos secundários por laboratórios parceiros. Do total de isolados de *A. flavus*, 25,3% foram capazes de produzir aflatoxinas do grupo B e 50% do grupo *Flavi* foram produtoras de aflatoxinas do grupo B e G, mostrando o potencial destas espécies para a produção destas micotoxinas.

Para a análise de aflatoxinas a metodologia foi validada no laboratório. Os valores médios de recuperação para os níveis de 0,5; 5,0 e 15,0 µg/Kg foram de 83,6; 85,7 e 86,3% respectivamente. Os limites de detecção e quantificação obtidos foram de 0,03µg/Kg e 0,2µg/Kg para aflatoxinas totais, respectivamente. A tabela 3 apresenta as médias de aflatoxinas nas amostras de castanha em relação à sua origem, bem como a variação obtida.

Tabela 3. Média de aflatoxinas totais em µg/Kg em e variação.			
Origem	Nº amostras/ nº amostras positivas	Média de aflatoxinas totais (µg/kg)	Variação de aflatoxinas totais (µg/kg)
Floresta Pará	7/2	1,29	ND* – 6,62
Processadora Pará	20/13	6,96	ND – 74,71
Mercado Pará	11/3	12,73	ND – 139,37
Mercado Amazonas	12/8	1,64	ND – 7,44
Mercado São Paulo	7/3	0,13	ND – 0,59

* ND = Não detectado (limite de detecção do método: 0,03 µg/Kg)

CONCLUSÕES

Através dos resultados foi possível concluir que os fungos pertencentes à seção *Flavi* fazem parte da micobiota da castanha do Brasil. De todas as cepas de *Aspergillus flavus* e do grupo *Flavi* isoladas até o momento (1222), 38,3% apresentaram capacidade de produção de aflatoxinas.

A alta incidência dessas espécies aflatoxigênicas na castanha do Brasil demonstra a importância do monitoramento desses bolores em toda a sua cadeia produtiva. A adoção de boas práticas na colheita, transporte e comercialização da castanha são práticas que devem ser adotadas e serão as responsáveis pela baixa incidência desses bolores toxigênicos e da aflatoxinas neste produto.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- EURACHEM GUIDES, The fitness for purpose of analytical methods. A laboratory guide to method validation and related topics. Teddington: LGC, 1998
- FILTENBORG, O., FRISVALD, J.C., SVENDENSEN, J.A., Simple screening method for molds producing intracellular mycotoxins in pure cultures. *Applied and Environmental Microbiology*, v.45, p.581-585, 1983.
- GREENPEACE. Viva Amazônia. Disponível em:
<<http://www.greenpeace.org.br/vivaamazonia/docs/castanha.doc>> Acesso em: 02 out. 2008.
- KLICH, M.A. & PITT, J.I. A Laboratory Guide to Common *Aspergillus* Species and their teleomorphs. *Division of Food Science and Technology*, North Ryde, Austrália 134p, 1988.
- PITT, J.I. and A.D. HOCKING. Fungi and Food Spoilage. *Blackie Academic & Professional*, London. 2ª Edição 593p., 1997.
- STROKA, J.; ANKLAM, E.; JORISSEN, U.; GILBERT, J. 2000. Immunoaffinity Column Cleanup with Liquid Chromatography Using Post-Column Bromination for Determination of Aflatoxins in Peanuts Butter, Pistachio Paste, Fig Paste and Paprika Powder: Collaborative Study. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists International*, Baltimore, v.83, n.2, p.320-340, 2000.
- VALOIS A.C.C. Aflatoxinas: um perigo que pode estar na castanha-do-Brasil, 2003. Disponível em: <<http://www.folhadetefe.com.br/>> Acesso em: 17 mar. 2008.